### WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Būro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/22566 C07K 1/06, 1/04 A1 (43) Internationales C07C 271/22 Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1992 (23.12.92)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP92/01280

(22) Internationales Anmeldedatum:

5. Juni 1992 (05.06.92)

(30) Prioritätsdaten:

P 41 19 544.2

13. Juni 1991 (13.06.91) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GE-SELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FOR-SCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BARTL, Ralf [DE/DE]; FRANK, Ronald [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROTECTED AMINO-ACID UNIT, ITS PREPARATION AND ITS USE

(54) Bezeichnung: GESCHÜTZTER AMINOSÄUREBAUSTEIN, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

#### (57) Abstract

The invention concerns an amino-acid unit for use in peptide synthesis in which a hydrogen atom of the amino group entering into a peptide bond is protected by a temporary amino protection group which can be cleaved under non-acid conditions. It is characterized in that the second hydrogen atom of this amino group is protected by a further protection group which can be introduced by a Mannich reaction. The invention also relates to a method of preparing the said amino-acid unit and to its use in peptide synthesis.

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist; die Erfindung betrifft zudem ein Verfahren zur Hertellung des obengenannten Aminosäurebausteins und die Verwendung davon bei der Peptidsynthese.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

	_	-	**	MN	Mongolci
ΑŤ	Osterreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich		• :
88	Barbudos	GA	Gabon	MW	Malawi
86	Belgien	C8	Vereinigtes Köntgreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ LB	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
_	• •	IE	Irland	RU	Russische Föderation
UR	Brasilien			SD	Sudan
CA	Kanada "	ıτ	Italien	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan		
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Suhweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Luchtenstein	TD	Tschad
	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Tugo
CM			_	US	Vereinigte Staaten von Amerika
C?	Tschechoslowakei	เเบ	Luxemburg	-	
DE•	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
***	•	144	Meli		

Geschützter Aminosaurebaustein. Herstellung und Verwendung

In der molekularbiologischen und medizinischen Forschung sind chemisch synthetisierte Peptide (Oligo- und Polypeptide) zu einem wichtigen Hilfsmittel geworden. Sie werden eingesetzt zur Herstellung spezifischer Antikörper für Immunaffinitätschromatographie, Identifizierung unbekannter Genprodukte und Entwicklung von Vaccinen gegen Krankheitserreger, als Peptidhormone und deren Analoga mit agonistischer oder antagonistischer Wirkung, als Modellverbindungen in Proteinstrukturuntersuchungen u.v.a.

Diese Peptide sind über Amidbindungen (Peptidbindungen) verknüpfte Oligo- bzw. Polymere (n bis etwa 150) von Aminosäuren.

Aminosäure Peptid

Im folgenden werden unter Peptiden auch solche verstanden, die außer den 20 natürlichen L-a-Aminosäuren auch Nicht-a-, D- bzw. chemisch modifizierte Aminosäuren (beliebiges R) enthalten. Die chemische Synthese der Peptide erfolgt stufenweise durch Verknüpfung (Kopplung) geeignet geschützter Aminosäure-, Dioder Oligopeptidbausteine. Verschiedene Syntheseverfahren, die

- 2 -

sich in der Art der Schutzgruppen und der Chemie der Bindungsknüpfung unterscheiden, gehören zum Stand der Technik. Einen Überblick geben:

- R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)
- E. Wünsch et al. in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, Band 15 (E. Müller, Herausgeber) Thieme, Stuttgart, 1974;
- G. Barany, R. B. Merrifield, The Peptides, Vol. 2 (E. Gross,
  - J. Meienhofer, Eds) Academic Press, New York, 1979, p. 1

Im Verlauf vieler Synthesen kann es zu problematischen Abschnitten kommen, von denen an die Kopplungsausbeute rapide sinkt. Bei einzelnen Peptiden kann dies bereits nach sehr wenigen Kopplungen eintreten (schwierige Sequenzen). Verantwortlich für dieses Phänomen ist in erster Linie die Faltung der Peptidkette zu ß-Faltblattstrukturen durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken. Die N-terminalen Aminofunktionen sind dann für eine chemische Reaktion nicht mehr vollständig zugänglich. An der Faltung der Peptide sind die Amidprotonen der Peptidbindung maßgeblich beteiligt. (R. C. de L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, J. Am. Chem. Soc., 112, 6039 (1990).

Bisher sind schon eine Reihe von Versuchen unternommen worden. die Ausbildung der β-Faltblattstrukturen zu vermeiden. Neben der Variation von Temperatur, Lösungsmittel und geringere Trägerbeladungen wurden auch verschiedene Zusätze wie Salze oder Harnstoff während der Synthese getestet (z. B. F. C. Westall, A. B. Robinson, J. Org. Chem., 35, 2842 (1970) und R. C. de L. Milton et al. 1990, s.o.).

Das wirkungsvollste aber auch schwierigste Konzept zur Vermeidung der Wasserstoffbrücken setzt auf die chemische Modifizierung der Aminosäure mit einer zusätzlichen Schutzgrupe für das zweite N-, insbesondere aN-Proton (H. Eckert, C. Seidel, Angew.

WO 92/22566 PCT/EP92/01280

Chem., 98, 168 (1986)). Eine wichtig Voraussetzung für die Syntheseeignung ist die Ortogonalität der neuen Schutzgruppe zu den bereits verwendeten. Außerdem sollte sie keinen negativen Einfluß (sterisch oder elektronisch) auf die Aminofunktion haben. Diese Schutzgruppe bleibt dann während der Synthese erhalten und wird erst nach dem Aufbau des vollständigen Peptids abgespalten.

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese gelöst, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, wobei dieser Baustein dadurch gekennzeichnet ist,

- (a) daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist, und
- (b), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Dipeptidbaustein handelt, auch das Wasserstoff-Atom der Peptidbindung durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein kann, oder
- (c), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Oligopeptidbaustein handelt, auch ein bis alle Wasserstoff-Atome der Peptidbindungen durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein können.

Bei dem erfindungsgemäßen Aminosäurebaustein kann es sich um einen Baustein für eine einzelne Aminosäure, um einen Dipeptidbaustein oder um einen Oligopeptidbaustein handeln.

Bei der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe kann es sich um eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -ständige Aminogruppe handeln.

Bei der temporären Aminoschutzgruppe kann es sich um eine Urethangruppe handeln, beispielsweise Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).

Die Carboxylgruppe des Aminosäurebausteins kann frei, ebenfalls geschützt oder aktiviert (Aktivester) vorliegen.

Der erfindungsgemäße Aminosäurebaustein kann durch eine weitere Schutzgruppe (R'''-X-CH2-) gekennzeichnet sein, die unter Verwendung von Formaldehyd und einer H-aziden Verbindung (R'''-X-H; R''': Rest der Mannich-Reaktionskomponente), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise eines Alkohols (R'''-OH), eines Thioalkohols (R'''-SH) oder eines sekundären Amins (R'''-NR'YH; Riv: weiterer Rest der Mannich-Reaktionskomponente, kein Wasserstoff), mit Hilfe der Mannich-Reaktion einführbar ist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Aminosäurebausteins für die Peptidsynthese, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man von einem üblichen Aminosäurebaustein ausgeht, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, und das andere Wasserstoff-Atom frei ist, und diesen üblichen Aminosäurebaustein einer Mannich-Reaktion unter Verwendung einer H-aziden Verbindung (R'''-X-H), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise unter Verwendung eines Alkohols, eines Thioalkohols oder eines sekundären Amins, unterwirft.

Die erfindungsgemäßen Aminosäurebausteine lassen sich zur Peptidsynthese, insbesondere zur Peptidsynthese nach Merrifield und beispielsweise nach der Fmoc-tBu-Methode verwenden. Für das erfindungsgemäße Synthesekonzept wurden also Schutzgruppen auf der Basis aminomethylierter Verbindungen der allgemeinen Formel R'''-X-CH2- entwickelt. Darin bedeutet X ein Heteroatom mit freiem Elektronenpaar und R''' einen beliebigen Rest der Mannich-Reaktionskomponente. Diese Schutzgruppen können sauer abgespalten werden.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Aminosäurebausteins kann man von einem üblichen Aminosäurebaustein der folgenden allgemeinen Formel ausgehen:

R-CO-NH-CHR'-COOR''

WO 92/22566 PCT/EP92/01280

Die entstehende Aminosäure entspricht dann

R-C-N-CHR'-COR'

II I

O CH<sub>2</sub>

mit R-CO:  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe nach Stand der Technik, die unter nicht sauren Bedingungen abgespalten werden kann; R': Seitenkette der AS; R'': OH, Aktivester oder Schutzgruppe; R''': Rest der neuen Schutzgruppe; X: O, S, NR<sup>N</sup> (R<sup>N</sup>  $\neq$  H) etc.

Die Einführung der Schutzgruppe durch eine Mannich-Reaktion (z. B. M. Tramontini, L. Angiolini, Tetrahedron, 46, 1791 (1990) (Review)) erfolgt nach dem folgenden Schema:

Prinzipiell läßt sich eine solche Mannich-Reaktion auch mit einem vollgeschützen Di- oder Oligopeptid durchführen. Dabei wird die neue Schutzgruppe sowohl am N-Terminus, als auch an den mittelständigen Peptidbindungen eingeführt. Damit ließe sich ein in den für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmittel unlösliches Oligopeptidfragment in eine lösliche Form überführen. Die Abspaltung erfolg als Rückreaktion.

Im Folgenden wird die Anwendung dieses Konzepts in der Fmoc-Strategie aufgezeigt (G. B. Fields, R. L. Noble, Int. J. Peptide Protein Res., 35, 161 (1990)).

Geschützte Fmoc-Aminosäure

Beispiele für die Variationsvielfalt der Schutzgruppen sind

Fmoc-(Ptm)Gly-OH

Ptm: Phenylthiomethyl-

Fmoc-(Ptm)Ala-OH

Fmoc-(Ptm)Val-OH

Fmoc-(Etm)Ala-OH

Etm: Ethylthiomethyl-

Fmoc-(Etm)Val-OH

Fmoc-(Mom)Gly-OH

Mom: Methyloxymethyl-

Fmoc-(Mom)Ala-OH

Fmoc-(Bom)Val-OH

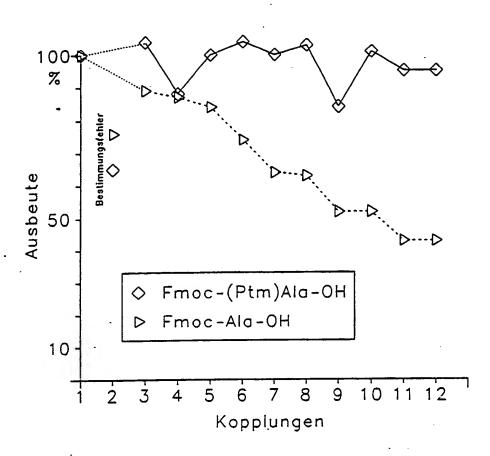
Bom: Benzyloxymethyl-

die als farblose, zähe Öle erhalten werden. Zur vereinfachten linearen Schreibweise wird die zusätzliche  $\alpha$ N-Schutzgruppe in runden Klammern vor das Symbol für die Aminosäure gesetzt.

Bei der Einführung der neuen Schutzgruppe fällt die neue Aminosäure als rotationsgehindertes Konformerengemisch der CO-N-Bindung an (Signalverdopplung im NMR-Spektrum), was aber für die Peptidsynthese nicht von Belang ist.

Die Einsetzbarkeit dieser Aminosäurederivate für die Peptidsynthese konnte durch die Darstellung eines vollständig geschützten Tripeptid gezeigt werden. Die Synthese des Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz erfolgte in Lösung.

Für die Untersuchungen der Kopplungsausbeuten im Verlauf der Synthese einer schwierigen Modelsequenz (Ala)<sub>13</sub> wurde die Festphasensynthese herangezogen. Für die zweite  $\alpha$ -N-Schutzgruppe wurde die Phenylthiomethyl-Gruppe (Ptm) gewählt. Während der Synthese mit konventionellem Fmoc-Ala-OH beobachtet man schnell einen allmählichen Ausbeuteabfall. Bei Verwendung der neuen, geschützten Aminosäure Fmoc-(Ptm)Ala-OH findet man unter gleichen Reaktionsbedingungen keine Ausbeuteverluste.



#### Methoden

#### Allgemeine Darstellung der Aminosäuren

1 mmol konventionell geschützte Aminosāure (gegebenfalls als Alkalisalz mit kat. Mengen Citronensāure) werden mit ca. 3-6 fachem Überschuß Paraformaldehyd und ca. 10 fachem Überschuß H-acider Verbindung in einem gasdichten und druckstabilen Reaktionsgefäß eingeschlossen und 2 d bei 90-100 °C gerührt. Die Reinigung erfolgt durch Flüssigkeitschromatographie über C-18 Kieselgelmaterial in säurefreiem Acetonitril/Wassergradienten.

## Darstellung von Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz

#### Fmoc-(Mom)Gly-OLi

Fmoc-Gly-OH wird vorteilhaft als Lithiumsalz für die o. a. Vorschrift eingesetzt. Fmoc-(Mom)Gly-OLi wird nahezu quantitativ erhalten.

<u>MS:  $C_{19}H_{19}NO_5$  (341)</u> EI: m/e (%) = 341 (1, M<sup>+</sup>), 30 (2, M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>OH), 266 (<1, 309-CO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>), 178 (100, Fluorenyl)

#### Fmoc-(Mom)Gly-Val-OBz

48,6 μmol Fmoc-(Mom)Gly-OLi und 50 μmol HOBt werden in 200 μl DMF gelöst und mit 48,6 μmol DIPC 15 min voraktiviert. 121 μmol H-Val-OBz-HCl und 100 μmol DMAP werden in 200 μl DMF gelöst und beide Lösungen Vereinigt. Nach 1 h wird mit etwas Wasser versetzt und die Lösung im Vakuum eingedampft. Trennung durch Flüssigkeitschromatographie mit Acetonitril/Wasser über C-18 Kieselgel ergibt ca. 50 % Dipeptid.

<u>MS:  $C_{31}H_{34}N_2O_6$  (530)</u> FAB+: m/e (%) = 553 (1, M<sup>+</sup>+Na), 531 (1, M<sup>+</sup>), 499 (12, M-CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>), 277 (10, 499-Fmoc), 179 (Fluorenyl)

#### H-(Mom)Gly-Val-OBz

Das Fmoc geschützte Dipeptid wird mit ca. 300  $\mu$ l 20% Piperidin/DMF 20 min behandelt und nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum w. o. chromatographisch getrennt (quantitativ).

<u>MS:  $C_{16}H_{24}N_2O_4$  (308)</u> FAB+: m/e = 277 (9, M-CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>), 265 (100, 277-CH<sub>2</sub>)

#### Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz

70  $\mu$ mol Fmoc-(Mom)Gly-OLi werden mit 2 eq. HOBt und 1,1 eq. DIPC in 200  $\mu$ l DMF 15 min voraktiviert und mit 23  $\mu$ mol Dipeptid/200  $\mu$ l DMF versetzt. Nach einer Stunde wird mit etwas Wasser versetzt und für die Analytik durch HPLC getrennt.

<u>MS:  $C_{35}H_{41}N_{3}O_{8}$  (631)</u> FAB+: m/e = 556 (88, M<sup>+</sup>+2H-Phenyl), 334 (100, 556-Fluorenyl)

#### Darstellung der Ptm-AS Fmoc-(Ptm)Ala-OH

109,7 mg (0,33 mmol) Fmoc-Ala-OH·H<sub>2</sub>O, 50 mg (1.56 mmol) Paraformaldehyd und 400

 $\mu$ l Thiophenol werden wie oben umgesetzt. Chromatographie ergibt 40% Produkt als farbloses, zähes Öl.

MS:  $C_{25}H_{23}NO_4S$  (433) FAB+: m/e = 456 (1, M<sup>+</sup>+Na), 434 (2, M+H<sup>+</sup>), 324 (13, M<sup>-</sup>-Thiophenyl), 179 (100, Fluorenyl)

Die Synthese des (Ala)<sub>13</sub> erfolgte auf Cellulose-Disks mit säurelabilem Benzyllinker (R. Frank, R. Döring, Tetrahedron, 44, 6031 (1988)), die bereits mit Fmoc-Ala-OH beladen waren. Die Kopplung der übrigen AS erfolgte in 20 mM Aminosäurelösung mit ca. 4-fachem Überschuß zur Filterbeladung in DMF.

Je 1 eq. der entsprechenden Aminosäure wurde mit 1,5 eq. HOBt und 1,2 eq. DIPC 15 min voraktiviert und auf die mit 10  $\mu$ l Bromphenolblaulsg. (1 mg/1 ml DMF) angefärbten Filter gegeben. Nach einer Stunde Schwenken der Filter in der Reaktionslsg. wurden die noch gefärbten Filter mit je DMF,  $CH_2Cl_2$ , DMF je dreimal gewaschen und erneut eine Stunde mit Aminosäurelsg. behandelt. Noch gefärbte Filter wurden nach erneutem Waschen mit 30  $\mu$ l Ac<sub>2</sub>O/DIPEA (1:1) in 100  $\mu$ l DMF acetyliert. Anschließend wurden mit je 300  $\mu$ l 20% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppen gespalten. Zur Bestimmung der Kopplungsausbeuten wurde das Dibenzofluven-Piperidin in  $CH_2Cl_2$  UV-Vermessen ( $\epsilon_{301 \text{ nm}} = 8550$ ).

Die abschließende Abspaltung des Peptids erfolgte mit 95% TFA, 3% Cystein, 2%  $H_2O$ . Das lyophilisierte Produkt wurde dann durch HPLC getrennt und durch FAB-MS nachgewiesen.

#### Abkürzungverzeichnis

Ac<sub>2</sub>O Essigsäureanhydrid

Bom Benzyloxymethyl

DIPEA Diisopropylethylamin

DMAP Dimethylaminopyridin

DMF Dimethylformamid

DIPC Diisopropylcarbodiimid

El Elektronenstoß-Ionisation

Etm Ethylthiomethyl

FAB+ Fast Atom Bombardment, positive Ionen

Fmoc 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

HOBt Hydroxybenzotriazol

HPLC High Performance Liquid Chromatography

MS Massenspektroskopie

Mom Methyloxymethyl

NMR Nuaclear Magnetic Resonance

Ptm Phenylthiomethyl

TFA Trifluoressigsäure

UV Ultraviolett-Spektroskopie

Fmoc-(Mom)Gly-OH

## <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	Aufspaltung	J (Hz)	Integral	Position
7,76 7,59 7,40 7,31 4,82/4,59 4,55/4,39 4,25	'd' 'd' 't' 't' s · 2 d · 2 dt	-7 -6 -7 -6 6,0/7,0 -6,5/6,5	2 H } 2 H } 2 H } 2 H } 2 H 2 H 2 H 1 H	9-H, 12-H 15-H, 18-H 10-H, 11-H 16-H, 17-H 3-H 6-H 7-H
4,04/3,98 3,23/3,01	s·2 s·2		2 H 3 H	2-H 4-H

### <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	Aufspaltung	Position
		_
171,21/171,10	s·2	C-1
156,09/155,71	s·2	C-5
143,70	S	C-8, C-13
141.23/141,11	s-2	C-14, C-19
127,70	d )	
127,10	d (	C-9 - C-12
125,06/124,75	d⋅2 ∫	C-15 - C-18
119,90	d )	
79,44/78,91	t-2	C-3
67,90/67,30	t · 2	C-2
55,75/55,15	q-2	C-7
47,07	q	C-4
46,79/46,56	t-2	C-6

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dt = Dublett von Tripletts, ' ` = mit Feinaufspaltung

#### Patentansprüche

- 1. Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist,
  die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann,
  dadurch gekennzeichnet,
  - (a) daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgrupe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist, und
  - (b), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Dipeptidbaustein handelt, auch das Wasserstoffatom der Peptidbindung durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein kann, oder
  - (c), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Oligopeptidbaustein handelt, auch ein bis alle Wasserstoffatome der Peptidbindungen durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein können.
- 2. Aminosäurebaustein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Baustein für eine einzelne Aminosäure, um einen Dipeptidbaustein oder um einen Oligopeptidbaustein handelt.
- 3. Aminosäurebaustein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der eine Peptidbindung einzugehen-

WO 92/22566 PCT/EP92/01280

- 14 -

den Aminogruppe um eine alpha- oder beta-standige Aminogruppe handelt.

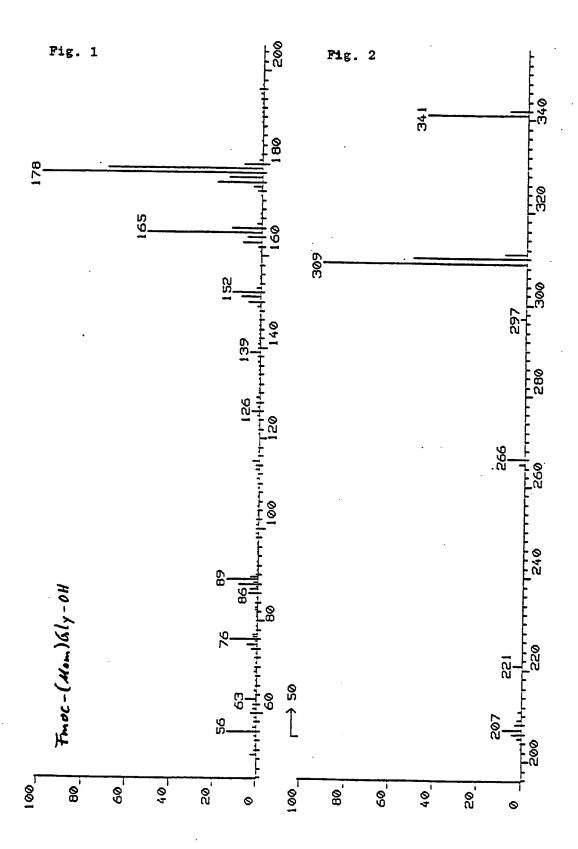
- 4. Aminosäurebausteln nach einem der vorhergehenden Ansprüche. dadurch gekennzelchnet, daß es sich bei der temporären Aminoschutzgruppe um eine Urethangruppe handelt, beispielsweise Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).
- 5. Aminosaurebaustein nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
  dadurch gekennzeichnet, daß die Carboxyigruppe des
  Aminosaurebausteins frei, ebenfalls geschützt oder aktiviert
  (Aktivester) vorliegt.
- 6. Aminosäurebaustein nach einem der vornergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine weitere Schutzgruppe (R'''-X-CH2-). die unter Verwendung von Formaldehyd und einer H-aziden Verbindung (R'''-X-H: R''': Rest der Mannich-Reaktionskomponente), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise eines Alkohols (R'''-OH), eines Thioalkohols (R'''-SH) oder eines sekundären Amins (R'''-NRIVH: RIV: weiterer Rest der Mannich-Reaktionskomponente, kein Wasserstoff), mit Hilfe der Mannich-nich-Reaktion einführbar ist.
- 7. Verfahren zur Herstellung eines Aminosaurebausteins für die Peptidsynthese, dadurch gekennzeichnet, daß man von einem üblichen Aminosäurebaustein ausgeht, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugenenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, und das andere Wasserstoff-Atom frei ist, und diesen üblichen Aminosaurebaustein einer Mannich-Reaktion unter Verwendung einer Haziden Verbindung (R'''-X-H), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknupft ist.

WO 92/22566 PCT/EP92/01280

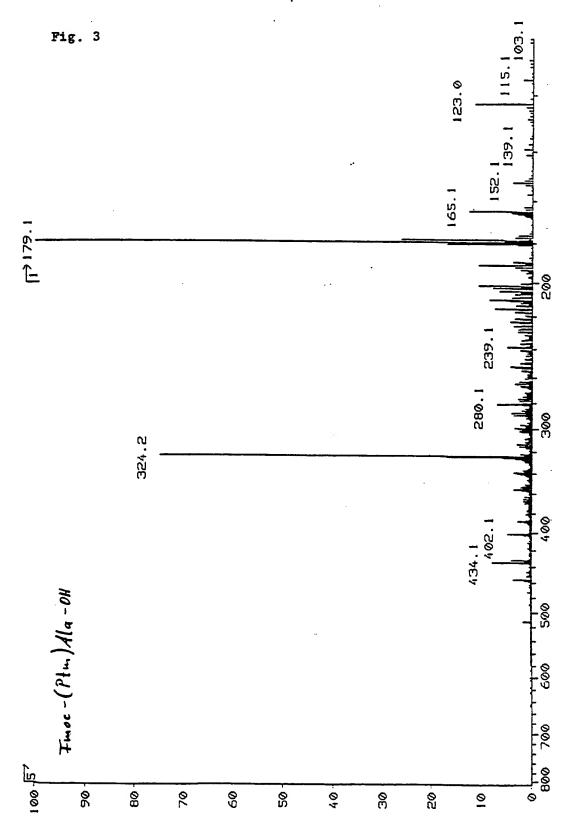
- 15-

beispielsweise unter Verwendung eines Alk h ls, eines Thioalkohols oder eines sekundären Amins, unterwirft.

- 8. Verwendung eines Aminosäurebausteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Peptidsynthese.
- 9. Verwendung nach Anspruch 8 bei der Peptidsynthese nach Merrifield.
- 10. Verwendung nach Anspruch 9 bei der Peptidsynthese nach Merrifield gemäß der Fmoc-tBu-Methode.



2/2



#### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01280

		101/11 72/	71200			
	•					
Int.Cl.: C 07 K 1/06; C 07 K 1/04; C 07 C 271/22						
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both	national classification and IPC				
	DS SEARCHED	- 1.00 1 1.1.1				
<u> </u>	cumentation searched (classification system followed by	y classification symbols)				
Int.Cl	2: с07к; с07с					
Documentati	ion searched other than minimum documentation to the	extent that such documents are included in th	e fields searched			
Electronic da	ita base consulted during the international search (name	of data base and, where practicable, search t	erms used)			
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where a	ppropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
х	TETRAHEDRON LETTERS.		1			
	vol. 22, No: 34, 1981, OXFORD G	B	•			
	pages 3249 - 3252; T SHONO ET AL.: 'a new carbon-p	hosphorus bond forming				
	reaction and synthesis of amino	alkylphosphonic acid	•			
	derivatives', see table II, com	pound 11				
х	TETRAHEDRON LETTERS.		1			
	No: 9, 1977, OXFORD GB	•	-			
	pages 749 - 750;	a for introducion				
	D H RICH AND J P TAM: ' a metho secondary amide bonds into stra					
	see the whole document, in part					
x	 CHEMISTRY LETTERS. No: 8, Augus	+ 1001 morayo m	1			
^	pages 1121 - 1124; T SHONO ET A	·	1			
-	of alpha - aminoalkylfurans and	its application to a				
	facile synthesis of pyridoxine					
	see the whole document, in part	icular table 11,				
Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.						
• Special categories of cited documents:  "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the property of the property of the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the property of the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the property of the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the property of the property of the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the property of t						
to be of particular relevance  "E" earlier document but published on or after the international filing date  "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be						
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other						
special reason (as specified)  "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered to involve an inventive step when the docum						
means  "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  being obvious to a person skilled in the art  "&" document member of the same patent family						
Date of the actual completion of the international search  Date of mailing of the international search report						
ll September 1991 (11.09.92) 14 October 1992 (14.10.92)						
Name and m	ailing address of the ISA/	Authorized officer				
European Patent Office						
Facsimile No		Telephone No.	•			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 92/01280

Continua	ation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
	compound 11	
x	CHEMISTRY LETTERS. No: 11, November 1989, TOKYO JP	1
	pages 1963 - 1966; T SHONO ET AL.: 'a new facile method for construction of beta-arylpyrrolidine rings and its application to	
	synthesis of racemic mesembrine' see compound 8 on page 1965	
A	CH, A, 516 523 (SOGESPAR) 15 December 1971 see the whole document	1–10
P,X	PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY (J A SMITH AND J E RIVIER, EDS). PROCEEDINGS OF THE XII AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, CAMBRIDGE, JUNE 16-21, 1991 ESCOM, LEIDEN	1–10
	Pages 505 - 506; R BARTL ET AL.: 'towards elimination of segmenzt insolubility during SPPS'	
	see the whole document	
ļ		
		l

## ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. SA 9201280

60417

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 11/09/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CH-A-516523	15-12-71	None .	
·			
·			
		•	
		·	· .
•			

FORM POCTS

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/01280

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>						
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC						
Int.K1	. 5 CO7K1/06	; C07K1/04;	C07C271/22			
II. RECHE	RCHIERTE SACHGE	BIETE				
		Recherchierter M	indestpriifstoff <sup>7</sup>			
Klassifika	tionssytem	K	lassifikationssymbole			
Int.K1	. 5	C07K; C07C	·			
		Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff ge unter die recherchierter		······································		
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
III. EINSC	HLAGIGE VEROFFE	NTLICHUNGEN 9				
Art.°	Kennzeichnung der	Veröffentlichung 11, soweit erforderlich unte	er Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. 13		
X	TETRAHEI	DRON LETTERS.		1		
		Nr. 34, 1981, OXFORD GE	· · ·			
		3249 - 3252;				
		ET AL.: 'a new carbon-p				
		reaction and synthesis kylphosphonic acid deriv				
		abelle II, Verbindung 1				
			•			
X		DRON LETTERS.		1		
	Nr. 9,	1977, OXFORD GB				
		749 - 750; H AND J P TAM: 'a method	i fam istuaduaise			
		ry amide bonds into stra				
	peptide		ind dyorro			
		as ganze Dokument, insbe	esondere			
	Verbind	ung nr. 6				
			-/			
	.,					
	-	gegebenen Veröffentlichungen 10:	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem is	sternationales As-		
def	iniert, aber nicht als be	aligemeinen Stand der Technik esonders bedeutsam anzusehen ist	meldedatum oder dem Prioritätsdatum ver ist und mit der Anmeidung nicht koliidier	röffentlicht worden		
		loch erst am oder nach dem interna- eröffentlicht worden ist	Verständnis des der Erfindung zugrundeli	egenden Prinzips		
"L" Ve	offentlichung, die geei	gnet ist, einen Prioritätsanspruch lassen, oder durch die das Veröf-	oder der ihr zugrundellegenden Theorie a  "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutu	ng; die beanspruch-		
fea	tlichungsdatum einer z	nderen im Recherchenbericht ge- belegt werden soll oder die aus einem	te Erfindung kann nicht als neu oder auf keit beruhend betrachtet werden	erfinderischer Tätig-		
and	eren besonderen Grun	d angegeben ist (wie ausgeführt)	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutun te Erfindung kann nicht als auf erfinderis	ng; die beanspruch- icher Tätiskeit be-		
	O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen einer oder menreren anderen Veröffentlichungen dieser Kate-					
	deht Historiichung, die war	dem internationalen Anmeldeda-	gorie in Verbindung gebracht wird und di- einen Fachmann naheilegend ist	ese Verbindung für		
tur		spruchten Prioritätsdatum veröffent-	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derseiben	Patentfamille ist		
1701.701.701.701						
IV. BESCI	TEINIGUNG		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	_		
Datum des	Abschlusses der interna	ationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recher	chenberichts		
	11. SEPTE	MBER 1992	10 4. 10. 11.			
Internationa	le Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediens	teten		
	EUROPA	ISCHES PATENTAMT	p. masturzo	•		
			I .			

Art °	LAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)  Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	•	
(	CHEMISTRY LETTERS.	1
	Nr. 8, August 1981, TOKYO JP	
	Seiten 1121 - 1124;	
	T SHONO ET AL.: 'one step synthesis of	
	alpha-aminoalkylfurans and its application to a	
1	facile synthesis of pyridoxine (vitamine b6)	
	siehe das ganze Dokument, insbesondere Tabelle	
	II, Verbindung 11	
		1
(	CHEMISTRY LETTERS.	•
	Nr. 11, November 1989, TOKYO JP	į
	Seiten 1963 - 1966;	
	T SHONO ET AL.: 'a new facile method for construction of beta-arylpyrrolidine rings and	
į	its application to synthesis of racemic	}
•	mesembrine'	1
	siehe Verbindung 8 auf Seite 1965	
	STELLE ACCIDITIONAL OF THE COLOR TRAD	
\	CH,A,516 523 (SOGESPAR) 15. Dezember 1971	1-10
,	siehe das ganze Dokument	
1	<b></b>	
, x	PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY (J A SMITH AND J	1-10
'	F RIVIER EDS). PROCEEDINGS OF THE XII AMERICAN	
	PEPTIDE SYMPOSIUM, CAMBRIDGE, JUNE 16-21, 1991	
	ESCOM, LEIDEN	
	Seiten 505 - 506;	
1	R BARTL ET AL.: 'towards elimination of segmenzt	}
į	insolubility during SPPS'	
	siehe das ganze Dokument	
•	<del></del> -	
1		
-		
1		
		1
-		
		Ī
- 1		

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

ΕP 9201280 SA 60417

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenhericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

11/09/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
CH-A-516523	15-12-71	Keine	
		·	
			·
		•	
•			

EPO PORM POCTS